



Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii
Katedra Onkologii

**Analiza ekspresji mikroRNA
z klastrów miR-17-92, miR-106b-25
i miR-106a-363 oraz genów z rodzin
MYC i *E2F* w nowotworach mózgu u dzieci**

mgr Renata Gruszka

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor dr hab. n.med. prof. UM Magdalena Zakrzewska

Łódź, 2021

Streszczenie

Nowotwory mózgu u dzieci stanowią drugą, pod względem częstości występowania grupę nowotworów wieku dziecięcego. Do najczęściej rozwijających się zmian należą gwiaździaki włosowatokomórkowe, rdzeniaki oraz mniej liczne wyściółczaki. Dotychczas wykazano, że w proces powstawania nowotworów, w tym nowotworów mózgu, mogą być zaangażowane niekodujące frakcje RNA m. in. mikroRNA. MiRNA podlegają zmianom regulacji i ekspresji, a ich poziomy mogą być związane z szeregiem cech klinicznych, dlatego w ostatnim czasie wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem miRNA jako markerów diagnostycznych oraz potencjalnych celów dla terapii ukierunkowanej molekularnie. Jedną z najbardziej rozpoznawalnych rodzin miRNA jest klaster miR-17-92 (OncomiR-1), którego składowe wykazują funkcje onkogenne, wpływając na proliferację komórek, apoptozę i angiogenezę. Klaster miR-17-92 posiada dwa paralogi miR-106a-363 i miR-106b-25. Istotne jest również, że występuje szereg oddziaływań pomiędzy poszczególnymi grupami miRNA i genami pełniącymi kluczowe funkcje komórkowe. Jednym z przykładów takich interakcji jest pętla sprzężenia zwrotnego między genami *MYC/E2F* a miR-17-92. Podwyższone poziomy miRNA z klastra miR-17-92 powodują zakłócenie homeostazy prowadzące do utraty zdolności do apoptozy i zwiększenia proliferacji komórek nowotworowych, natomiast hamowanie aktywności miR-17-92 odwraca te procesy.

Głównym problemem badawczym pracy było sprawdzenie, czy poziomy miRNA z klastrów miR-17-92, miR-106a-363 i miR-106b-25 mogą być związane z typem histologicznym i stopniem zaawansowania najczęstszych nowotworów mózgu u dzieci. Szczegółowe cele pracy to:

1. Ocena poziomów mikroRNA z klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i miR-106a-363 w gwiaździakach włosowatokomórkowych, wyściółczakach i rdzeniakach wieku dziecięcego.
2. Ocena ekspresji genów z rodzin *MYC* (*MYCC*, *MYCN*, *MYCL*) oraz genów z rodziny *E2F* (*E2F1*, *E2F2*, *E2F3*) w najczęstszych guzach mózgu u dzieci.
3. Ocena potencjalnych korelacji pomiędzy poziomami analizowanych frakcji miRNA a ekspresją genów z rodzin *MYC* oraz *E2F*.
4. Ocena znaczenia zmian ekspresji genów i miRNA w odniesieniu do wybranych cech klinicznych (typ histologiczny, stopień złośliwości).

Materiał badawczy stanowiły chorobowo zmienione tkanki najczęstszych typów dziecięcych guzów mózgu o różnym stopniu złośliwości, w tym gwiaździaków włosowatokomórkowych (1 stopień złośliwości wg WHO), wyściółczaków (2 stopień złośliwości wg WHO) wyściółczaków anaplastycznych (3 stopień złośliwości wg WHO) oraz rdzeniaków (4 stopień złośliwości wg WHO).

Analiza profilu ekspresji genów w badanych grupach nowotworów wykazała, że dla większej liczby genów odnotowano nadekspresję. Wykazano, że kaskady sygnałowe RAS/MAPK/ERK oraz PI3K/AK/mTOR należały do najbardziej zaburzonych szlaków w każdej z badanych grup. Korzystając z bioinformatycznych baz danych wytypowano potencjalne miRNA mogące regulować aktywowane geny w szlakach RAS/MAPK/ERK oraz PI3K/AK/mTOR. Szczegółowa analiza wykazała, że elementy klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i miR-106a-363 mogą być zaangażowane w regulację genów *PIK3CB*, *PRKACB*, *MAP3K5* i *DUSP1*.

Analiza ekspresji genów wykazała, że gen *MYCN* osiągnął najwyższą nadekspresję w rodzinie genów *MYC*, natomiast geny *E2F1* i *E2F2* w rodzinie *E2F*. Niemal wszystkie cząsteczki miRNA z klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i miR-106a-363 charakteryzowały się podwyższonym poziomem w badanej grupie guzów. Najwyższymi poziomami ekspresji genów i miRNA charakteryzowały się rdzeniaki, następnie wyściółczaki i gwiaździaki włosowatokomórkowe. Wykazano, że wzrost poziomów miRNA oraz genów *MYCN*, *E2F1* i *E2F2* był zależny od stopnia złośliwości i typu histologicznego nowotworu.

Summary

Brain tumors in children are the second the most common group of childhood cancers with the most frequently occurring pilocytic astrocytomas, medulloblastomas and ependymomas. So far, it has been shown that non-coding RNA fractions, including microRNAs, may be involved in the formation of solid tumors, including brain tumours. Many tumor-related miRNAs showed changes in regulation and expression, and their levels may be associated with a number of clinical features. According to that recently there has been increasing interest in the use of miRNAs as diagnostic markers and potential targets for molecularly targeted therapy. One of the most recognizable miRNA family is the miR-17-92 cluster (OncomiR-1), whose components show oncogenic functions, influencing cell proliferation, apoptosis and angiogenesis. The miR-17-92 cluster has two paralogs miR-106a-363 and miR-106b-25. It is also important that there are a number of interactions between the miRNA and the genes that perform key cellular functions. One example of such interaction is the feedback loop between MYC/E2F genes and miR-17-92 cluster. Elevated levels of miRNAs from the OncomiR-1 disrupt homeostasis leading to decreased apoptotic ability and increased proliferation of tumor cells, while inhibition of miR-17-92 activity reverses these processes.

The main research problem of the work was to see if miRNA levels from miR-17-92, miR-106a-363 and miR-106b-25 clusters could be related to histological type and WHO grade of the most common brain tumors of childhood. The specific objectives of the study are as follows:

1. Assessment of the microRNA levels from miR-17-92, miR-106b-25 and miR-106a-363 clusters in pilocytic astrocytomas, ependymomas and medulloblastomas.
2. Assessment of the expression of genes from the *MYC* family (*MYCC*, *MYCN*, *MYCL*) and the *E2F* family (*E2F1*, *E2F2*, *E2F3*) in the most common brain tumors in children.
3. Assessment of the potential correlations between the analysed miRNA fractions and the expression of genes from *MYC* and *E2F* families.
4. Assessment of the significance of changes in gene expression and miRNA in relation to selected clinical features (histological type and grade of the tumor).

The biological material consisted of tumor tissues of the most common childhood brain tumors, including pilocytic astrocytomas (WHO grade 1), ependymomas (WHO grade 2), anaplastic ependymomas (WHO grade 3) medulloblastomas (WHO grade 4).

Analysis of the gene expression profile in the studied groups of tumors revealed that overexpression was noted for a lot number of genes. A detailed analysis showed that the RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR signalling cascades were among the most disrupted pathways in each of the studied groups. Using bioinformatics databases, potential miRNAs that could regulate activated genes in the RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways were carefully selected. Detailed analysis has shown the miR-17-92, miR-106b-25 and miR-106a-363 clusters members may be involved in the regulation of the *PIK3CB*, *PRKACB*, *MAP3K5* and *DUSP1* genes.

Gene expression analysis demonstrated that the *MYCN* gene achieved the highest overexpression among the *MYC* family and the *E2F1* and *E2F2* genes among the *E2F* family. Almost all miRNAs from miR-17-95, miR-106b-25, and miR-106a-363 clusters showed overexpression in the studied group of tumors. Medulloblastomas were characterized by the highest levels of gene and miRNA expression, followed by ependymomas and pilocytic astrocytomas. It was proved that the increased levels of miRNA and *MYCN*, *E2F1* and *E2F2* genes was dependent on the grade and the histological type of the tumor.

